

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jan Rasl

REGULACE COFILINU SIGNÁLNÍ DRÁHOU ERK

THE REGULATION OF COFILIN BY THE ERK SIGNALING CASCADE

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Tomáš Vomastek, Ph.D.

Praha, 2012

Děkuji svému školiteli Ing. Tomáši Vomastkovi, Ph.D. a dále Mgr. Josefu Čáslavskému za cenné rady a trpělivost, kterou mi věnovali při psaní této bakalářské práce. Také děkuji své rodině a přátelům za morální podporu, které se mi dostávalo během celého studia.

Prohlašuji, že jsem vypracoval tuto práci sám na základě konzultací se svým školitelem a z níže uvedené literatury.

Praha, 14. 5. 2012

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	4
2. Abstrakt	5
3. Abstract	6
4. Úvod	7
5. Aktin a aktinový cytoskelet	8
5.1. Tvorba aktinových filament	9
5.2. Aktin vazebné proteiny	10
5.3. Koloběh aktinu v migrující buňce	11
6. Cofilin a jeho regulace	12
6.1. Regulace aktivity cofilinu	13
6.1.1. Fosfatázy cofilinu – popis, regulace	13
6.1.2. Kinázy cofilinu (LIMK) – popis, regulace	14
7. Rodina malých Rho-GTPáz	15
7.1. Regulace aktivity Rho-GTPáz	15
7.2. Efektorové proteiny Rho-GTPáz	16
8. Signální kaskáda ERK	17
8.1. Princip a charakteristika MAPK-kaskád a signální kaskády ERK	18
8.2. ERK jako efektorová proteinkináza	19
8.3. RSK jako efektorová proteinkináza	20
9. Vstup signální kaskády ERK do regulace aktivity cofilinu	21
9.1. Regulace cofilinu na úrovni proteinů GAP	22
9.1.1. Inhibice funkce proteinu p190-RhoGAP fosforylací proteinkinázou ERK	22
9.1.2. Inhibice funkce proteinu p190-RhoGAP změnou exprese proteinů Rnd	23
9.1.2.1 Popis proteinů Rnd	23
9.1.2.2 Regulace proteinů Rnd	23
9.1.3. Inhibice funkce proteinu CdGAP	24
9.2. Regulace na úrovni proteinů GEF	24
9.2.1 Aktivace proteinu GEF H1	24
9.3. Regulace proteinů GEF a GAP proteázou calpain	25
9.3.1 Degradace proteinu Tiam1 pomocí proteázy calpain	25
9.3.2. Degradace proteinkinázy FAK pomocí proteázy calpain	26
9.4. Regulace na úrovni Rho GTPáz	26
9.4.1. Inhibice Rho GTPázy proteinem p27 ^{Kip1}	26
9.4.1.1. Regulace proteinu p27 ^{Kip1}	27
9.5. Regulace na úrovni proteinkináz ROCK, PAK	27
9.5.1. Inhibice proteinkinázy ROCK proteinkinázou Raf1	28
9.5.2. Inhibice proteinkinázy ROCK proteinem p21 ^{Cip1/Waf1}	29
9.5.2.1. Regulace proteinu p21 ^{Cip1/Waf1}	29
9.5.3. Snížení exprese proteinkinázy ROCK	30
9.5.4. Regulace proteinkinázy PAK	31
9.6. Regulace exprese proteinkinázy LIMK2 a cofilinu	31
10. Závěr	32
11. Seznam použité literatury	34

1. Seznam použitých zkratek

ADF	Actin depolymerizing factor
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
CDK	Cyclin-dependent kinase
CIN	Chronophin
CRD	Cysteine-rich domain
DRF	Diaphanous-related formins
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
F-aktin	The polymer form of actin
FAK	Focal adhesion kinase
G-aktin	The monomer form of actin
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guanosine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
JNK	c-Jun amino-terminal kinases
LIMK	LIM-kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKAPK	Mitogen activated protein kinase-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MK2	Mitogen activated protein kinase-activated protein kinase 2
MNK	MAPK-interacting kinase
MRCK	Myotonic dystrophy kinase related Cdc42 binding
mRNA	messenger RNA (ribonucleic acid)
MSK	Mitogen and stress activated kinase
NGF	Nerve growth factor
NLK	Nemo like kinase
PAK	p21-activated kinase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pleckstrin homology
Pi	Inorganic phosphate (PO_4^{3-})
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PTB	Phosphotyrosine-binding
RBD	Ras/Rho binding domain
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SH2	Src homology 2
SOS	Son of sevenless
SSH	Slingshot
TESK	Testicular protein kinase
TNF- α	Tumor necrosis factor α

2. Abstrakt

Cofilin je malý aktin vazebný protein, který se účastní polymerace a depolymerace aktinových vláken. Cofilin se účastní celé řady buněčných procesů, kde je vyžadována přestavba aktinového cytoskeletu, jako například buněčné dělení a buněčná migrace. V tomto ohledu má buňka řadu vzájemně propojených signálních drah, které umožňují přesnou a také dynamickou regulaci aktivity cofilinu. Jednou z těchto drah je i signální MAP-kinázová kaskáda ERK (extracellular signal-regulated kinase). Ačkoliv dodnes nejsou zcela známy molekulární mechanismy, kterými signální kaskáda ERK reguluje aktivitu cofilinu, tak se zdá, že signální kaskáda ERK reguluje cofilin hlavně skrze regulaci malých GTPáz rodiny Rho. Signální kaskáda ERK dokáže modulovat činnost Rho GTPáz na mnoha úrovních, od úrovně regulátorů aktivity Rho GTPáz, jako jsou proteiny GAP (GTPase activating protein) a GEF (guanine nucleotide exchange factor), až po úroveň efektorů Rho GTPáz. Signální kaskáda ERK využívá dva základní mechanismy pro modulaci aktivity těchto signálních drah. První mechanismus je na transkripční a translační úrovni, kdy signální kaskáda ERK indukuje či reprimuje transkripci a následně i translaci klíčových regulačních proteinů. Druhý mechanismus je mnohem dynamičtější a odehrává se na úrovni posttranslačních modifikací, a to zejména fosforylací. V této práci jsou shrnuty známé způsoby vstupů signální kaskády ERK do regulace signálních drah rodiny Rho GTPáz a jejich dopad na aktivitu cofilinu.

Klíčová slova: aktin, cofilin, rodina Rho-GTPáz, signální kaskáda ERK

3. Abstract

Cofilin is small ubiquitous actin binding protein, which is required for polymerization and depolymerization of actin fibers. Cofilin is involved in numerous cellular processes where the remodeling of actin cytoskeleton is required, such as cell division and cell migration. In order to precisely and dynamically regulate the cofilin activity, cells utilize large network of interconnected signaling pathways. One of these signaling pathways is the MAP-kinase cascade ERK (extracellular signal-regulated kinase), although the molecular mechanisms by which ERK regulates cofilin activity are not fully understood. Much evidence suggests that ERK controls the cofilin activity mainly through the regulation of Rho family of small GTPases. The ERK signaling cascade can modulates the Rho GTPase pathway signaling components, such as GAPs (GTPase activating proteins), GEFs (guanine nucleotide exchange factors) or Rho GTPases effectors. The ERK signaling cascade utilizes two different mechanisms for the regulation of Rho GTPases signaling pathways. The first mechanism is on transcriptional and translational level, where ERK regulates the transcription and subsequently translation of key regulatory proteins. Second mechanism, which is far more dynamic, occurs at the level of posttranslational modification, especially phosphorylation. This work summarizes known means by which the ERK signaling cascade regulates Rho GTPases and the activity of cofilin.

Key words: actin, cofilin, family of Rho-GTPases, signaling cascade ERK

4. Úvod

Aktin je velice konzervovaný a všudypřítomný protein, esenciální pro všechny buňky eukaryotické říše. Podílí se na mnoha buněčných dějích, jakými jsou například mechanická podpora buněk, dělení buněk, endocytóza a následný pohyb váčků. Ve všech těchto dějích je potřeba, aby byl aktin schopen polymerovat do vyšších struktur a zároveň aby tyto struktury mohly být následně rozrušeny.

Z tohoto důvodu je nutné, aby buňka měla ve své výbavě řadu prostředků, které by se podílely na regulaci aktinu a remodelovaly jeho struktury. Jedním z nich je i cofilin, malý aktin vazebný protein. Cofilin je stejně jako aktin rozšířený ve všech eukaryotických buňkách a svou aktivitou řídí polymeraci, fragmentaci a depolymeraci aktinových vláken. Dynamické změny v aktivitě cofilinu a jím zprostředkované změny aktinového cytoskeletu pomáhají buňce vypořádat se s neustále se měnícím prostředím a na tyto změny reagovat odpovídajícím způsobem. Jednou z nejdůležitějších funkcí cofilinu je regulace aktinového cytoskeletu během migrace. Buněčná migrace je mimořádně důležitá pro celou řadu fyziologických buněčných dějů a defekty v jeho regulaci vedou k řadě patologických procesů. V krajním případě mohou být i letální.

Regulace cofilinu je primárně doménou rodiny malých Rho GTPáz – Rac1, Cdc42 a Rho. Tyto GTPázy slouží jako molekulární přepínače, jejichž aktivita se mění v závislosti na vnějších podnětech. Jedním z důležitých regulátorů, který následně zaznamenává a vyhodnocuje širokou škálu vnějších podnětů a následně moduluje aktivitu Rho GTPáz, je signální dráha ERK. Mutace v genech, které vedou k hyperaktivaci signální kaskády ERK, jsou jedním z nejdůležitějších kroků nádorového procesu. Hyperaktivace signální kaskády ERK vyvolává mimo jiné i změny v aktinovém cytoskeletu a činí buňky více motilní, což také přispívá k tvorbě nádorových metastáz s negativním následkem pro mnohobuněčný organismus. Pochopení, jakým způsobem signální kaskáda ERK reguluje signální dráhu Rho, a tím i buněčnou motilitu, by nám umožňovalo porozumět mechanismu invazivity nádorů a aplikovat tyto poznatky při vývoji protinádorových léčiv. Nicméně poznání tohoto procesu není důležité pouze v souvislosti s nádorovými buňkami. Stejný či podobný mechanismus je využíván i za nepatologických podmínek a díky tomu může docházet k vývoji jedince, tvorbě nových nervových zakončení, regeneraci tkání a v neposlední řadě také k imunitním odpovědím.

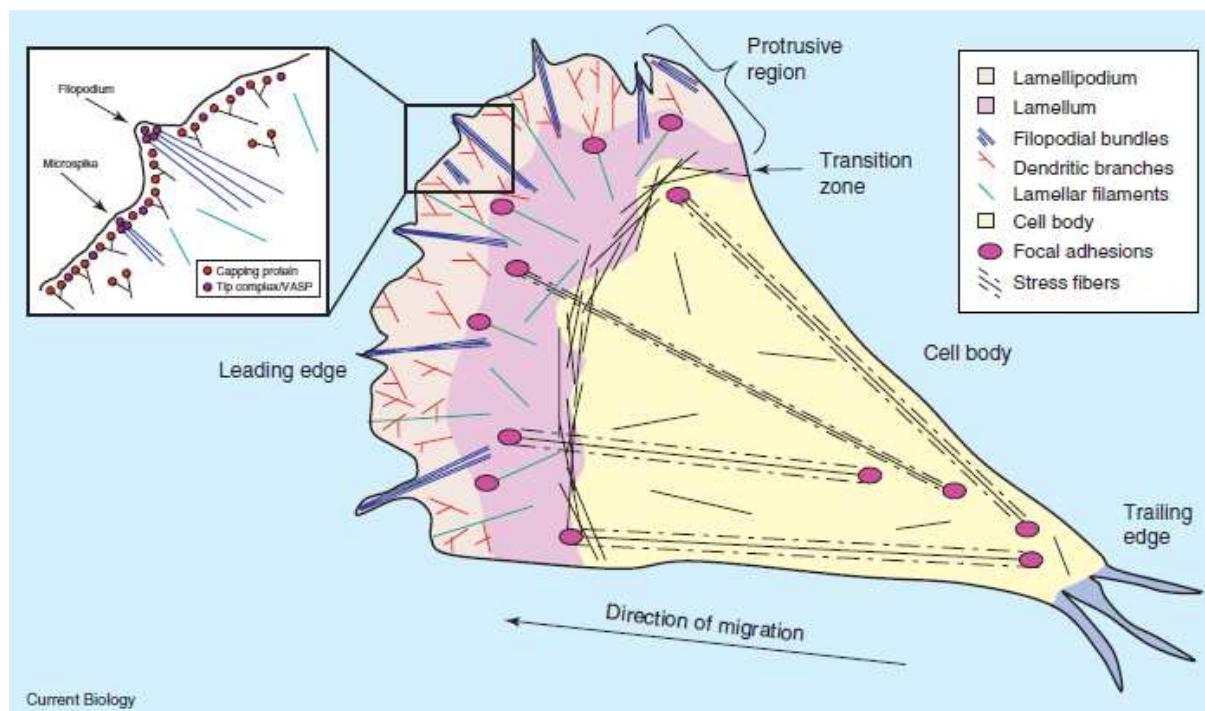
Od osmdesátých let minulého století, kdy byly rodiny Rho GTPáz objeveny, vznikla na jejich téma řada publikací, které jsou místy poměrně detailní. Popisují jejich regulaci,

biochemickou podstatu jednotlivých kroků a jejich působení na své efektorové proteiny. Stejně tvrzení se dá vznést i na MAPK kaskádu ERK, kde také víme mnohé o regulaci, o jednotlivých krocích přenosu signálu v rámci této kaskády a o jejím působení v buňce. Naopak co je dnes málo probádanou oblastí, je vzájemná komunikace, ovlivňování a případně i spolupráce těchto dvou signálních drah. Stále není objasněno, jakým způsobem je signální kaskáda ERK schopná regulovat funkci rodiny Rho GTPáz, následně cofilinu a tím i modulovat aktinový cytoskelet a buněčnou migraci. Tato práce si klade za cíl popsat základní způsoby regulace aktivity cofilinu signální kaskádou ERK. Detailní pohled je věnován zejména dvěma základním mechanismům, kterými signální kaskáda ERK reguluje aktivitu cofilinu. První z nich se odehrává na úrovni exprese klíčových regulačních proteinů, zatímco druhý mechanismus je přímý a odehrává se na úrovni posttranslačních modifikací regulačních proteinů, a to zejména na úrovni fosforylace.

5. Aktin a aktinový cytoskelet

Aktin, 43 kDa veliký protein, je jedním z nejhojnějších proteinů v eukaryotických buňkách a může tvořit až 5% celkových buněčných proteinů. Byl objeven ve 40. letech minulého století, a proto je již poměrně probádaným proteinem. K pochopení funkce aktinu, aktinového cytoskeletu a regulačních mechanismů mimo jiné přispěly i patogenní organismy, které jej využívají pro vlastní pohyb v rámci hostitelské buňky (Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005; Pollard a Cooper, 2009).

Aktin se v buňkách nalézá ve dvou základních stavech. Může se vyskytovat ve formě monomeru, pak hovoříme o tzv. G-aktinu, nebo ve formě polymeru, tedy F-aktinu. Všechny aktinové podjednotky jsou ve vláknech uloženy ve stejném směru (tzv. „head-to-tail“ organizace), aktinové vlákno je tedy polární struktura s rozlišitelnými konci. Konec aktinového vlákna, kde dochází přednostně k polymeraci aktinu, je označován jako plus konec (někde také „barbed end“). Opačný konec, kde dochází přednostně k disociaci aktinu, označujeme jako mínus konec („pointed end“) (Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005). Aktinová vlákna se mohou dále organizovat a spolu s dalšími proteiny tvořit vyšší struktury (Obr. 1). Aktinová vlákna se vyskytují buď ve formě aktinové sítě, jako je tomu v lamelliopodiu na předním okraji buňky, nebo mohou tvořit nevětvené svazky, jako v případě stresových vláken. Ty pak můžeme ještě rozdělit na dorzální a ventrální stresová vlákna a na transversální oblouky (Naumanen *et al.*, 2008). Tato organizace aktinového cytoskeletu je charakteristická pro migrující buňku (Obr. 1).



Obr. 1: Model migrující buňky. Na modelu jsou znázorněny struktury účastnících se pohybu buňky, na kterých se podílí aktin (Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005).

5.1. Tvorba aktinových filament

Aby se aktinový monomer mohl účastnit tvorby aktinových vláken, musí se nalézat v komplexu aktin-ATP. Pouze tento komplex může tvořit nové vlákno nebo prodlužovat vlákno již stávající. Po začlenění aktinového monomeru do vlákna dochází během 1-2 sekund k hydrolýze ATP a vzniku komplexu aktin-ADP-Pi. Tento komplex má ve vlákne prakticky stejné vlastnosti jako komplex ATP-aktin. Po hydrolýze dochází k postupnému uvolňování anorganického fosfátu a snížení stability vlákna. Tento proces probíhá spontánně a řádově pomaleji, s poločasem přibližně 350 sekund. Nicméně buňka může tento proces urychlit za pomoci aktin vazebných proteinů, např. za pomoci cofilinu, a tím snížit stabilitu aktinových vláken (Pollard a Borisy, 2003).

K prodlužování aktinových filament dochází rychleji na plus konci vlákna. Tento fakt je dán odlišnými asociačními a disociačními konstantami ATP-aktinu a ADP-aktinu na koncích filamenta. I když na plus konci vlákna dochází k rychlejší disociaci ADP-aktinu, rychlá asociace ATP-aktinu nedovolí ADP-aktinu včas oddisociovat. Na minus konci dochází k pomalé disociaci jak ATP-aktinu, tak i ADP-aktinu. Tento proces je podmíněn koncentrací ATP-G-aktinu a aktivní regulací buňkou (Pollard a Borisy, 2003; Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005).

Kritickým bodem tvorby nového vlákna je počátek polymerace. Je to z toho důvodu, že aktinové dimery nebo trimery jsou velice nestabilní, a proto nemůže spontánně aktinové vlákno v buňce vzniknout. Z tohoto důvodu je pro vznik nového vlákna podstatné vytvoření tzv. nukleačního centra, které podporuje vznik vlákna stabilizací aktinových dimerů a trimerů. Následná polymerace či prodlužování vlákna probíhá samovolně a rychle. Samotné aktinové vlákno bez asociovaných proteinů je v buňce velice nestabilní, což může mít, v závislosti na koncentraci ATP-G-aktinu, za následek jeho rychlou degradaci z obou konců. Samotná depolymerace aktinového vlákna je pak podmíněna hydrolýzou ATP a uvolněním anorganického fosfátu (Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005; Pollard a Cooper, 2009).

5.2. Aktin vazebné proteiny

Proteiny schopné vázat se k aktinu a regulovat strukturu cytoskeletu můžeme rozdělit do několika skupin – proteiny vázající monomerní aktin (Profilin, Thymosin- β 4), proteiny zodpovědné za tvorbu nukleačního centra a nukleace aktinu (Arp2/3 komplex, Forminy), proteiny aktivující nukleační centrum (WASP/Scar), proteiny stabilizující aktinová vlákna (Tropomyosin, tzv. „capping“ proteiny) a proteiny zodpovědné za depolymeraci vláken (Cofilin).

Aktinové monomery jsou z důvodu regulace v buňce vyvázány na aktin vazebných proteinech. Zatímco Thymosin- β 4 vyvazuje aktinové monomery a brání jim začlenění do vlákna, profilin podporuje jejich polymeraci, ale pouze na plus konci vlákna. Profilin také podporuje výměnu ADP za ATP na aktinových monomerech. Začátek polymerace je zprostředkován po aktivaci proteinů WASP/Scar za pomoci Arp2/3 komplexu. Tento komplex svou strukturou mimikuje mínus konec aktinového vlákna, která je klíčová pro podporu polymerace. Po nasednutí na již existující aktinové vlákno iniciuje polymeraci nového vlákna a dává pod úhlem 70° vzniknout novému aktinovému vláknu (Pollard a Cooper, 2009; Watanabe, 2010). Dalšími faktory indukující nukleaci aktinu jsou proteiny z rodiny forminů. Na rozdíl od Arp2/3 komplexu forminy se podílí na tvorbě nevětvených aktinových vláken. Dále svojí přítomností na plus konci vlákna podporují polymeraci aktinu (Zigmond, 2004).

K zastavení polymerace aktinu slouží tzv. capping proteiny (např. heterodimerické capping proteiny, gelsolin, Esp8, Aip1), které svou vazbou na plus konec vlákna brání nasedání dalších aktinových monomerů. Tyto proteiny také zároveň stabilizují konec vlákna a brání tak disociaci aktinových podjednotek (Nicholson-Dykstra *et al.*, 2005).

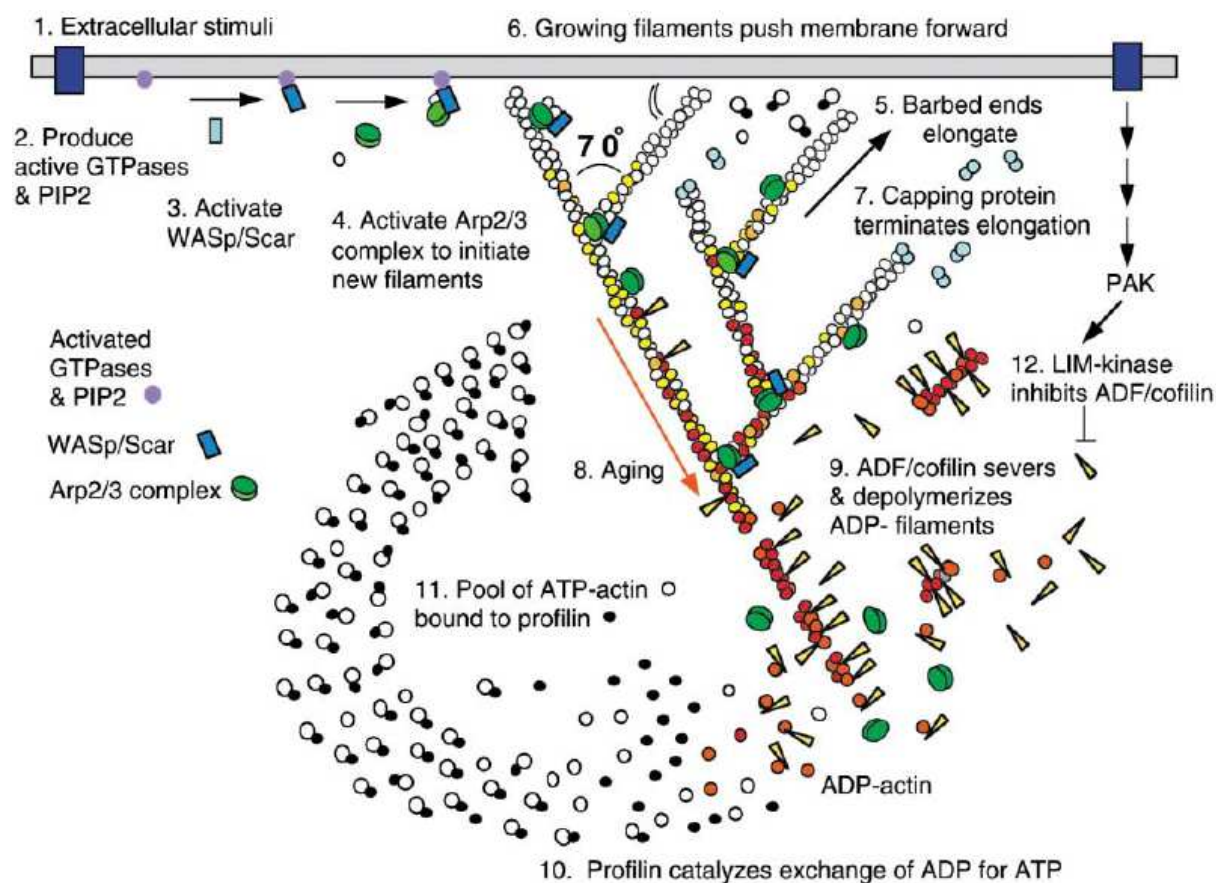
Jak již bylo zmíněno, aktinové vlákno samo o sobě není v buňce stabilní a potřebuje mít na sobě navázány proteiny bránící degradačním vlivům. Jedním z nich je i tropomyosin, který je schopný se vázat podél aktinových vláken, poskytovat jim vyšší mechanickou odolnost a ochranu proti štěpení cofilinem. Vazba tropomyosinu navíc zabraňuje větvení a nukleaci aktinových vláken zprostředkovaných aktivovaným Arp2/3 komplexem. V migrujících buňkách se tropomyosin vyskytuje hlavně podél stresových vláken a také v zadních částech lamelliopodia (Cooper, 2002).

Štěpení a depolymerace aktinových vláken je nezbytným krokem, který je zapotřebí k odstranění přebytečných či nepotřebných vláken. K tomuto účelu slouží především malý aktin vazebný protein cofilin, který vyvolává zlomy v aktinových vláknech, a tím indukuje jejich depolymerizaci. Funkce a regulace cofilinu je diskutována v šesté kapitole.

5.3. Koloběh aktinu v migrující buňce

Během migrace buňky je nevyhnutelná přestavba aktinového cytoskeletu. To platí zejména pro vedoucí konec migrující buňky, kde se tvoří hustá aktinová síť. Vlivem extracelulárních signálů dochází k vytvoření nukleačních center, k tvorbě a k prodlužování aktinových vláken směrem k plasmatické membráně. Síla vytvořená růstem vláken je využita na tlačení membrány ve směru pohybu. Na mínus konci aktinových vláken, v zadní části lamelliopodia, dochází k jejich postupné degradaci, mimo jiné za přispění cofilinu. Takto vzniklý monomerní aktin se váže na profilin, který katalyzuje výměnu ATP za ADP a tím umožňuje monomernímu aktinu účastnit se dalšího cyklu polymerace (Obr. 2). Tento proces, který zahrnuje kontinuální polymeraci a depolymeraci aktinových vláken, je v anglicky psané literatuře nazýván jako „actin treadmilling“. (Pollard a Borisy, 2003; Watanabe, 2010).

Stresová vlákna naopak nepodstupují rychlý obrat aktinu a jsou stabilní. Jejich přínos k pohybu tkví v tom, že jsou za přispění myosinu schopné kontrakce, která umožňuje migrující buňce přitáhnout její zadní část ve směru pohybu. Jednotlivé typy stresových vláken přispívají k pohybu různou měrou (Naumanen *et al.*, 2008).



Obr. 2: Obrat aktinu ve vedoucím konci buňky (Pollard a Borisy, 2003).

6. Cofilin a jeho regulace

Jedním z důležitých proteinů, účastnících se přestavby aktinového cytoskeletu, je cofilin. Je to malý (15-21 kDa) aktin vazebný protein patřící do rodiny označované jako ADF/cofilin, rozšířený ve všech eukaryotech. Cofilin je esenciální protein a jeho deregulace může mít za následek řadu patologií (Van Troys *et al.*, 2008). Cofilin se účastní zejména degradace aktinových vláken, avšak za určitých podmínek se může podílet i na jejich tvorbě.

Cofilin způsobuje rozpad vlákna tím, že je schopný se navázat mezi dvě aktinové podjednotky a způsobit strukturní změny ve vlákne, respektive změnu vinutí cca o 5° na podjednotku aktinu a narušit tím stabilitu vlákna (McGough *et al.*, 1997). Cofilin se váže s vyšší afinitou k ADP-aktinu, než k ATP-aktinu. Při vazbě na aktinové vlákno s ADP podporuje jeho degradaci. Cofilin také stimuluje uvolnění anorganického fosfátu z komplexu ADP-Pi-aktin v aktinovém vlákne. Dále je schopný se vázat na monomerní ADP-aktin a inhibovat nukleotidovou výměnu (Van Troys *et al.*, 2008).

Účinky cofilinu na aktinový cytoskelet závisí mimo jiné na jeho koncentraci (Andrianantoandro a Pollard, 2006). Ke štěpení aktinových vláken dochází při nízké

koncentraci aktivního cofilinu. Pokud se koncentrace cofilinu zvýší a dojde k navázání cofilinu podél celého vlákna, dochází paradoxně k jeho stabilizaci a nikoliv ke štěpení. Při velmi vysokých koncentracích aktivního cofilinu je schopen asociovat s monomerním aktinem a iniciovat jeho nukleaci.

K dnešnímu dni byly objeveny v savčích buňkách tři izoformy cofilinu – cofilin-1, cofilin-2 a ADF (Actin-Depolymerising factor, také známý jako destrin). Jednotlivé formy jsou tkáňově specifické. Zatímco cofilin-2 je exprimován ve svalových buňkách, cofilin-1 a ADF se vyskytují v ostatních tkáních. Tato tkáňově specifická exprese koreluje s jejich vztahem k aktinu. Cofilin-2, v porovnání s cofilinem-1 a ADF, má nejnižší afinitu k ADP/ATP aktinu, nejslabší degradační schopnost a nejsilnější nukleační aktivitu. Z tohoto důvodu je aktin ve svalových buňkách stabilní. (Vartiainen *et al.*, 2002).

6.1. Regulace aktivity cofilinu

Cofilin může být fosforylován na konzervovaném N-koncovém aminokyselinovém zbytku Ser3 (Agnew *et al.*, 1995). Cofilin ve fosforylované formě se není schopen vázat ke G-aktinu i k F-aktinu, a naopak jeho defosforylace vede k plné aktivaci a možnosti regulovat aktinový cytoskelet. Regulace fosforylace na Ser3 zbytku je tedy jednoduchým přepínačem mezi tvorbou aktinových vláken a jejich rozpadem.

6.1.1. Fosfatázy cofilinu – popis, regulace

Při prvotním hledání možných proteinů schopných aktivovat cofilin se věnovala pozornost proteinfosfatázám se širokým spektrem substrátů. Inhibice těchto proteinfosfatáz neprokázala, že by se účastnily defosforylace cofilinu. V nedávné době byly objeveny dvě rodiny proteinfosfatáz, které defosforylují aktivní cofilin za fyziologických podmínek. Je to rodina proteinfosfatáz Slingshot (SSH1/2/3) a proteinfosfatáza Chronophin (CIN). Stále ještě zůstává mnoho nezodpovězených otázek nad jejich funkcí i nad jejich regulací. Je to dáno také tím, že byly objeveny poměrně nedávno, a proto je nebylo možné detailně charakterizovat. Tyto proteinfosfatázy hrají roli při dělení buňky a funkce proteinfosfatázy SSH byla prokázána také při migraci buňky (Huang *et al.*, 2006).

Aktivita proteinfosfatázy SSH je podmíněna fosforylací na Ser402 v katalytické doméně, přičemž stejně jako v případě cofilinu vede defosforylace k jeho plné aktivaci. Aktivace proteinfosfatázy SSH je zprostředkována Ca^{2+} dependentní fosfatázou calcineurin (Wang *et al.*, 2005). Naopak fosforylaci, tedy deaktivaci, zprostředkovává proteinkináza D

(Barisic *et al.*, 2011). Byla také pozorována interakce mezi proteinfosfatázou SSH a proteinem 14-3-3, přičemž tato interakce bránila aktivaci cofilinu (Kligys *et al.*, 2007).

6.1.2. Kinázy cofilinu (LIMK) – popis, regulace

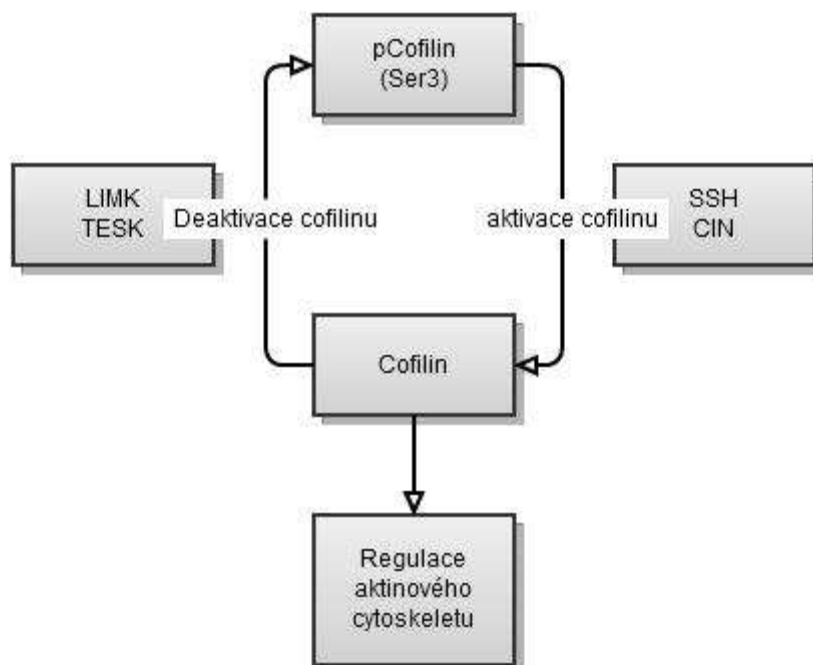
K dnešnímu dni byly objeveny dvě rodiny proteinkináz schopných fosforylovat a deaktivovat cofilin. Jsou to LIM-kinázy (LIMK1 a LIMK2) a TES-kinázy (TESK1 a TSK2). Zajímavé je, že dodnes u nich nebyl nalezen jiný substrát než cofilin. Zatímco proteinkinázy LIMK1 i LIMK2 jsou přítomné ve všech tkáních (Acevedo *et al.*, 2006; Foletta *et al.*, 2004), aktivita proteinkináz TSK je tkáňově specifická (Toshima *et al.*, 1995; Toshima *et al.*, 2001). Z tohoto důvodu zde nebudou proteinkinázy TSK dále rozebírány a pozornost bude věnována pouze proteinkinázám LIMK.

Oproti výše zmíněným proteinfosfatázám SSH a CIN je regulace proteinkináz LIMK daleko lépe popsána. Jejich aktivita je podmíněna fosforylací threoninového zbytku v aktivační smyčce – proteinkináza LIMK1 je fosforylována na threoninu 508 (Ohashi *et al.*, 2000) a proteinkináza LIMK2 na threoninu 505 (Sumi *et al.*, 2001a).

Defosforylace a následné deaktivace proteinkináz LIMK se mohou účastnit i proteinfosfatáza SSH. Soosairajah a spolupracovníci (2005) popsali schopnost interakce mezi proteinfosfatázou SSH a proteinkinázou LIMK1, která vedla k defosforylaci na Thr508, tedy k její inaktivaci. Zvyšuje se tedy komplexita celé regulace. Zda je hlavním cílem proteinfosfatázy SSH aktivovat cofilin nebo inaktivovat proteinkinázu LIMK, zůstává nezodpovězeno.

Mezi hlavní proteinkinázy, které se účastní fosforylace proteinkináz LIMK v pozici Thr508 (LIMK1) a Thr505 (LIMK2), patří proteinkinázy PAK (p21-activated kinase) a ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase). Aktivace těchto proteinkináz je pod přímou kontrolou malých GTPáz z rodiny Rho. Tedy, aktivita proteinkinázy PAK je pod kontrolou Rac1 GTPázy a účastní se regulace aktinového cytoskeletu ve vedoucím konci vlákna. Aktivitu proteinkinázy ROCK kontroluje Rho GTPáza a jsou nezbytné pro tvorbu a udržení stresových vláken (Maekawa *et al.*, 1999; Ridley, 2001). Malé GTPázy rodiny Rho (Rho, Rac1, Cdc42) jsou tedy dominantními faktory, které regulují aktivitu proteinkinázy LIMK a následně cofilinu. Kromě výše zmíněných proteinkináz PAK a ROCK je proteinkináza LIMK také aktivována proteinkinázami MRCK a MK2 (MAPKAPK2). Proteinkináza MRCK je aktivována malou GTPázou Cdc42 a fosforyluje proteinkinázu LIMK2 na aktivačním Thr505 (Sumi *et al.*, 2001b). Proteinkináza MK2 je aktivována

proteinkinázou p38 a fosforyluje serinový zbytek 323 proteinkinázy LIMK (Kobayashi *et al.*, 2006). Nicméně, v případě proteinkináz MRCK a MK2 jsou naše poznatky kusé a není jasné, zdali tyto proteinkinázy hrají při regulaci cofilinu dominantní nebo marginální úlohu.



Obr. 3: Schéma přímé regulace aktivity cofilinu. Proteinkinázy LIMK/TESK jsou schopné fosforylovat cofilin na jeho Ser3 a uvádí jej do inaktivního stádia. Naopak proteinfosfatázy SSH/CIN defosforylují cofilin a umožňují mu vstoupit do regulace aktinového cytoskeletu.

7. Rodina malých Rho-GTPáz

Jak již bylo zmíněno, Rho GTPázy patří mezi hlavní regulátory cofilinu a tedy i aktinového cytoskeletu. Jedná se o rodinu malých GTPáz, které spadají do rodiny Ras GTPáz. Ačkoliv je dnes známo mnoho členů rodiny Ras GTPáz, ve vztahu k buněčné migraci jsou nejlépe charakterizované GTPázy RhoA, Rac1 a Cdc42 (Bustelo *et al.*, 2007).

7.1. Regulace aktivity Rho-GTPáz

Jak již jejich název napovídá, aktivita malých GTPáz je založena na tom, zda jsou v komplexu s GTP či GDP. Do aktivního stavu jsou uváděny za pomoci proteinů GEF (guanine nucleotide exchange factor), které jsou schopné se na Rho-GTPázy vázat a zprostředkovávat výměnu GDP za GTP. Naopak, jejich deaktivace je podmíněna hydrolýzou GTP. Ačkoliv GTPázy mají schopnost hydrolyzovat GTP a sami sebe deaktivovat, je tento

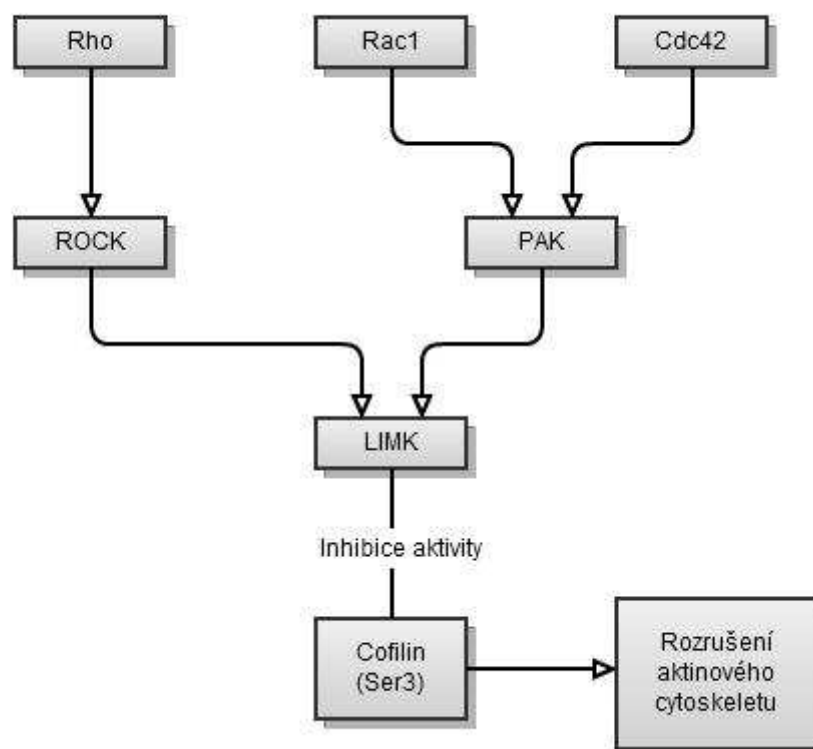
proces poměrně pomalý. Proto je zapotřebí dalších regulačních proteinů, proteinů GAP (GTPase-activating protein), které stimulují hydrolýzu GTP. Tento způsob regulace dává buňce možnost regulovat aktivitu Rho GTPáz. Dalším způsobem regulace Rho GTPáz je za pomoci proteinů GDI (guanosine nucleotide dissociation inhibitors). Tyto proteiny jsou schopné se na Rho GTPázy vázat a tvořit s nimi komplex. Pokud se naváží na neaktivní formu Rho GTPázu, tedy na Rho-GDP, pak efektivně brání výměně GDP za GTP. Inhibiční efekt mají i při vytvoření komplexu GDI-Rho-GTP. Ačkoliv brání hydrolýze GTP, zároveň nedovolují Rho-GTPázám interagovat se svými efekty. Proteiny GDI mají také schopnost sekvestrovat Rho GTPázy a přemístit je z periferie buňky do cytoplazmy (Ellenbroek a Collard, 2007).

7.2. Efektorové proteiny Rho-GTPáz

Poté, co jsou GTPázy rodiny Rho aktivovány pomocí proteinů GEF, mohou aktivovat své efekty a podílet se na remodelaci aktinového cytoskeletu. V současné době je známo několik desítek proteinů, které mohou být Rho GTPázami aktivovány.

Mezi nejlépe charakterizované efekty proteinů Rho patří proteinkinázy z rodiny ROCK a forminy z rodiny DRF (Diaphanous-related formins). Mezi hlavní efekty proteinkinázy ROCK patří proteinkináza LIMK a myosin fosfatázy (aktivátory myosinových lehkých řetězců). Proteinkináza ROCK je tedy klíčovým faktorem v regulaci stability aktinových vláken a také v regulaci aktino-myosinové kontraktility. Stimulace proteinů DRF (mDia1, mDia2 a mDia3) vede polymeraci aktinu a tvorbě nevětvených aktinových vláken. Tvorba nevětvených aktinových vláken se odehrává převážně v oblasti nově se formujícího filopodia (Amano *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 1999).

Mezi hlavní efekty GTPáz Rac1 a Cdc42 patří proteiny WASP/WAVE, proteiny DRF a proteinkinázy rodiny PAK. Proteiny WASP/WAVE stimulují aktivaci Arp2/3 komplexu a iniciují polymeraci větveného aktinu pod plasmatickou membránou. Aktivovaná proteinkináza PAK, kromě dalších svých substrátů, fosforyluje a aktivuje proteinkinázu LIMK a stejně jako proteinkináza ROCK se inhibicí aktivity cofilinu podílí na stabilitě aktinových struktur (Bishop a Hall, 2000).



Obr. 4: Schéma regulace aktivity cofilinu GTPázami Rho, Rac1 a Cdc42 a jejich hlavních efektorů.

GTPázy Rho/Rac1/Cdc42 v komplexu s GTP se podílejí na aktivaci svých substrátů ROCK/PAK, ty poté aktivují proteinkinázu LIMK. Proteinkináza LIMK následně fosoryluje cofilin na jeho Ser3, což vede k jeho inaktivaci a proto není schopen se nadále podílet na přestavbě aktinového cytoskeletu.

8. Signální kaskáda ERK

Buňka je neustále vystavována extracelulárním podnětům a vlivům, které musí rozpoznat, a na které musí adekvátním způsobem reagovat. V eukaryotických buňkách existují evolučně konzervované signální kaskády MAPK („mitogen-activated protein kinases“), které se spolu s dalšími mechanismy podílejí na zpracování těchto podnětů a na specifické buněčné odpovědi. Signální kaskáda ERK, která je složena z proteinkináz Raf, MEK a ERK, je jednou z těchto signálních drah regulujících genovou expresi, buněčné dělení, motilitu, přežívání a apoptózu (Rubinfeld a Seger, 2005). Signální kaskáda ERK patří mezi jednu z nejlépe prostudovaných MAPK kaskád. K intenzivnímu studiu této dráhy přispěl i fakt, že v nádorových buňkách je signální kaskáda ERK často mutovaná, hlavně v proteinech Ras či Raf. Tyto mutace vedou ke vzniku konstitutivně aktivních proteinů a následně k hyperaktivaci signální kaskády ERK.

Dlouho se předpokládalo, že primární funkcí signální kaskády ERK je regulace genové exprese a buněčné proliferace. Dnes už je zřejmé, že signální kaskáda ERK reguluje také řadu dalších buněčných dějů, včetně buněčné migrace a invazivity (Huang *et al.*, 2004).

Celá řada prací ukazuje, že signální kaskáda ERK je schopná regulovat aktivitu cofilinu a měnit aktinový cytoskelet v buňce. V případě patologických procesů, jako je zhoubné buněčné bujení, tyto změny v signální kaskádě ERK dávají možnost pro větší invazivitu buněk, a tedy i pro schopnost opustit místo primárního nádoru a tvořit metastázy.

8.1. Princip a charakteristika MAPK-kaskád a signální kaskády ERK

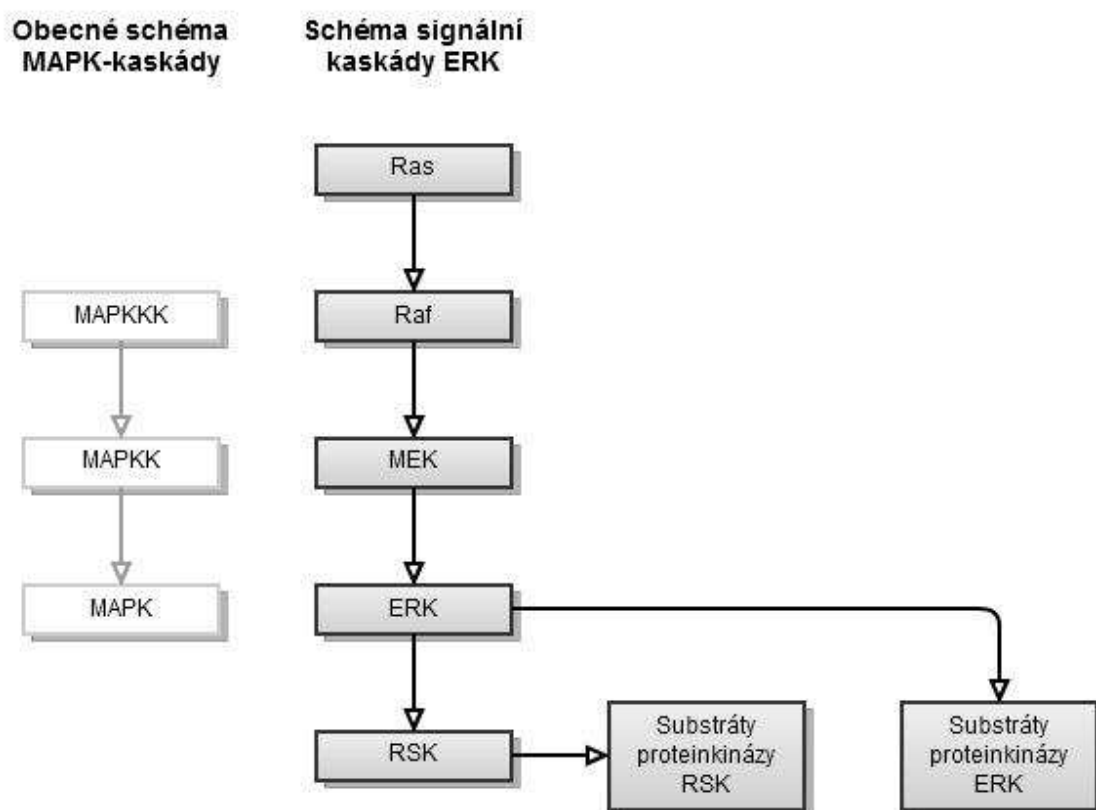
K dnešnímu dni byly u savců objeveny čtyři základní skupiny MAPK kaskád, pojmenovaných podle posledních členů kaskády – ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases), JNK1/2/3 (c-Jun amino-terminal kinases), p38 izoformy (p38 α , β , γ , δ) a ERK5. Mezi „atypické“ MAPK kaskády patří ERK3/4, ERK7 a Nemo-like kinases (NLK). Mezi nejvíce studovanými MAPK kaskádami u savců jsou ERK1/2, JNK a p38 (Cargnello a Roux, 2011).

MAPK kaskáda se skládá ze tří proteinkináz. Těmi jsou MAPK (mitogen-activated protein kinase), MAPKK (MAPK kinase kinase) a MAPKKK (MAP kinase kinase kinase). Přenos signálu v rámci MAPK kaskád je realizován pomocí následných fosforylačních kroků, kdy proteinkináza fosforyluje svou substrátovou proteinkinázu a tím ji aktivuje a posílá signál dál. Tedy poslední člen kaskády MAPK je fosforylována MAPKK a ta je fosforylována MAPKKK. V případě signální kaskády ERK je proteinkináza ERK (MAPK) fosforylována proteinkinázami MEK1/2 (MAPKK) a ta je fosforylována proteinkinázami Raf (MAPKKK) (Obr. 5). Členění do jednotlivých stupňů je pro buňku výhodou. Má možnost do signální kaskády na různých stupních vstupovat a přenášený signál na různých úrovních regulovat či modifikovat. Zároveň stačí malý počáteční signál pro aktivaci kaskády, která jej amplifikuje a může mít tedy vyšší dopad – každá MAP-kináza kaskády fosforyluje a aktivuje více svých substrátů. Nebo tomu může být naopak a signál může být efektivně umlčen (Rubinfeld a Seger, 2005).

K aktivaci signální kaskády ERK dochází z principu na buněčném povrchu. Signální kaskáda ERK může být aktivována rozličnými způsoby. Může být aktivována mnoha růstovými faktory, jakými jsou PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) či NGF (nerve growth factor), které aktivují receptorové proteinkinázy (RTK). Dále může reagovat na podněty přijatými heterotrimerickými G-proteiny či integriny (Pullikuth a Catling, 2007; Raman *et al.*, 2007).

Signalizace skrze RTK je jedním z nejlépe pochopených mechanismů vedoucích k aktivaci signální kaskády ERK. Vazba ligandu na RTK způsobí jeho dimerizaci, která podporuje jeho autofosforylaci na tyrozinovém zbytku a vede k aktivaci. Na aktivovaný RTK

se poté mohou vázat proteiny s SH2 (Src homology 2) nebo PTB (phosphotyrosine-binding) doménou, kam patří mimo jiné i protein Grb2. Na něj se poté váže protein SOS, což je Ras-GEF, dojde ke zprostředkování výměny GDP za GTP na GTPáze Ras, která následně zahájí aktivaci signální kaskády ERK (Cargnello a Roux, 2011).



Obr. 5: Obecné schéma MAPK-kaskády a signální kaskády ERK. Na schématu je znázorněna třístupňová organizace MAPK kaskády a odpovídající proteinkinázy signální kaskády ERK. Proteinkinázy ERK a RSK jsou efektorové proteinkinázy, které následně fosforylují velké množství svých substrátů.

8.2. ERK jako efektorová proteinkináza

Proteinkinázy ERK1 (44 kDa) a ERK2 (42 kDa) jsou posledními členy signální kaskády ERK. Tyto proteinkinázy jsou obecně rozšířené ve všech savčích tkáních a mezidruhově jsou vysoce konzervované (Boulton a Cobb, 1991). Proteinkinázy ERK1 i ERK2 jsou aktivované proteinkinázami MEK1/2, a to fosforylací threoninového a tyrosinového zbytku v motivu Thr-Glu-Tyr v aktivační smyčce v kinázové doméně. Pro plnou aktivaci je zapotřebí fosforylace jak threoninového, tak tyrosinového zbytku. Bylo prokázáno, že fosforylace tyrosinového zbytku je vyžadována, avšak není dostatečná pro aktivaci proteinkinázy ERK. Proteinkináza ERK se tedy může vyskytovat ve třech stavech, přičemž dva jsou neaktivní (nefosforylovaná či jednou fosforylovaná proteinkináza ERK) a pouze

dvakrát fosforylovaná proteinkináza ERK je plně aktivní (Boulton a Cobb, 1991; Cargnello a Roux, 2011).

Proteinkinázy ERK1 i ERK2 rozeznávají stejné aminokyselinové motivy na svých substrátech, které následně fosforylují a aktivují. Proteinkinázy ERK1 i ERK2 rozeznávají a fosforylují serinové či threoninové zbytky v sekvenci bohaté na proliny, respektive v sekvenci Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro (Gonzalez *et al.*, 1991). Navíc bylo dokázáno, že první prolin nemusí být vyžadován a na jeho místě se může vyskytovat neutrální či bazická aminokyselina, jak bylo pozorováno např. na proteinu SOS (CorbalanGarcia *et al.*, 1996).

Proteinkinázy ERK1 i ERK2 dokáží fosforylovat a tím měnit funkci celé řady proteinů; dnes je známo více než 170 jejich substrátů (Yoon a Seger, 2006). Aktivovaná proteinkináza ERK se poté účastní zejména buněčné proliferace, kde je důležitá pro aktivaci transkripčních faktorů (např. Elk1), které následně spouští expresi časných genů a indukují vstup do buněčného cyklu. Kromě transkripčních faktorů fosforyluje proteinkináza ERK také strukturní a regulační proteiny. Dále proteinkináza ERK fosforyluje a aktivuje některé proteinkinázy, označované jako MAPKAPK (Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase). Podobně jako proteinkináza ERK vykazují proteinkinázy MAPKAPK širokou substrátovou specifitu a fosforylují celou řadu proteinů. Buněčná odpověď tedy může být vyvolána přímo proteinkinázou ERK, nebo nepřímo aktivací proteinkináz MAPKAPK (Cargnello a Roux, 2011).

Mezi hlavní proteinkinázy MAPKAPK patří rodina proteinkináz RSK (p90 ribosomal S6 kinase), která je aktivována pouze signální kaskádou ERK. Proteinkináza ERK dokáže fosforylovat také proteinkinázy MNK a MSK (strukturní homology RSK), avšak ty mohou být aktivovány také p38 MAPK kaskádou (Cargnello a Roux, 2011).

8.3. RSK jako efektorová proteinkináza

Proteinkináza RSK („p90 ribosomal S6 kinase“) byla objevena na konci devadesátých let minulého století a patří do rodiny serin/threoninových proteinkináz. K dnešnímu dni byly objeveny čtyři izoformy – RSK1-4 se vzájemnou 75-80% aminokyselinovou homologií (Anjum a Blenis, 2008). Fosforylace proteinkinázy RSK proteinkinázou ERK je nezbytně nutná pro její aktivaci.

Po aktivaci je proteinkináza RSK schopna fosforylovat své substráty. Za použití syntetických peptidů byl identifikován konsenzus motiv, které proteinkináza RSK na svých substrátech rozeznává. Je to sekvence Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr, i když přítomnost

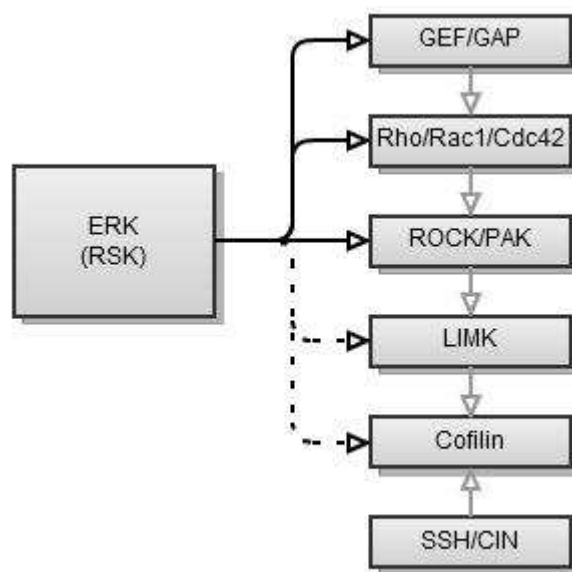
prvního argininového zbytku není striktně vyžadována. Tato konsenzus sekvence je sdílena i jinými proteinkinázami, jakou je například rodina proteinkináz MSK (Anjum a Blenis, 2008).

Jednotlivé izoformy proteinkinázy RSK se v buňce účastní regulace transkripce a translace, proliferace a buněčného růstu. Byla také prokázána role proteinkinázy RSK v migraci. Poprvé byla tato vlastnost naznačena schopností proteinkinázy RSK fosforylovat filamin A, na kterém rozeznává stejné fosforylační místo, jako proteinkináza PAK1. Dále byla pozorována jeho účast při epitelo-mezenchymální transici (EMT) zprostředkovanou proteiny Ras/ERK. Navíc se ukázalo, že proteinkináza RSK je schopna fosforylovat protein SH3P2, a tím jej inaktivovat. Tento protein je negativním regulátorem buněčné motility (Romeo *et al.*, 2012).

9. Vstup signální kaskády ERK do regulace aktivity cofilinu

Signální kaskáda ERK je jednou z mnoha drah, které svou činností regulují aktivitu cofilinu. Signální kaskáda ERK do regulace vstupuje hlavně modulací drah Rho GTPáz, které dokáže regulovat prakticky na všech jejích úrovních. Tedy na úrovni regulátorů GAP/GEF, na úrovni Rho-GTPáz i na úrovni jejich efektorových proteinů. Naopak přímá regulace proteinkinázy LIMK nebo cofilinu signální kaskádou ERK je jev spíše okrajový a pravděpodobně také tkáňově specifický. Dodnes nebyla popsána regulace proteinfosfatáz SSH a CIN proteinkinázou ERK. Regulace aktivity Rho GTPáz se účastní jak proteinkináza ERK, tak také proteinkináza RSK.

Z principu existují dva základní mechanismy, kterými může být cofilin ovlivňován. První z nich dokáže měnit transkripci proteinů, které se jeho regulace účastní, popřípadě i samotného cofilinu. Tento způsob je poměrně pomalý a buňka není schopná bezprostředně reagovat na nejrůznější podněty. Proto existuje ještě druhý, rychlejší mechanismus, který využívá posttranslační modifikace regulačních proteinů, přičemž nejčastější modifikací je fosforylace.



Obr. 6: Možnosti vstupu signální kaskády ERK do regulace signálních drah rodiny Rho GTPáz. Plnými čarami jsou znázorněny hlavní regulační vstupy proteinkinázy ERK (RSK) a přerušovanými čarami okrajové či tkáňově specifické vstupy do signální dráhy Rho GTPáz. Regulace proteinfosfatáz SSH a CIN signální kaskádou ERK není známa.

9.1. Regulace cofilinu na úrovni proteinů GAP

Ne této úrovni jsou známy dva mechanismy, kterými signální kaskáda ERK zasahuje do činnosti Rho/ROCK dráhy a mění úroveň fosforylace cofilinu. V prvním případě proteinkináza ERK fosforylací inhibuje protein p190-RhoGAP a působí pozitivně na dráhu Rho/ROCK. Naopak v druhém případě činnost proteinu p190-RhoGAP podporuje změnou exprese proteinů Rnd. Dále je znám vstup signální kaskády ERK do regulace Rac1 GTPázy, a to inhibicí funkce proteinu CdGAP.

9.1.1. Inhibice funkce proteinu p190-RhoGAP fosforylací proteinkinázou ERK

Regulace aktivity proteinu p190-RhoGAP má svou nezastupitelnou roli v regulaci aktivity cofilinu a maturaci fokálních adhezí v buňkách adherujících na ECM. Integriny aktivovaná proteinkináza ERK interaguje s C-koncovou částí proteinu p190-RhoGAP. V této oblasti byly nalezeny čtyři aminokyselinové zbytky, které mohou být fosforylovány proteinkinázou ERK. Jedná se o Ser1451, Ser1476, Thr1480 a Ser1483. Fosforylace těchto míst inhibuje aktivitu proteinu p190-RhoGAP a následně vede k aktivaci GTPázy Rho a její signální dráhy a zvýšení fosforylace cofilinu. Následuje maturace fokálních adhezí a tvoří se stresová vlákna (Pullikuth a Catling, 2010).

9.1.2. Inhibice funkce proteinu p190-RhoGAP změnou exprese proteinů Rnd

Zajímavé je, že signální kaskáda ERK je schopná funkci proteinu p190-RhoGAP také stimulovat. Je třeba ale podotknout, že se nejedná o stimulaci na úrovni fosforylace, ale o změnu exprese regulačních proteinů, kterými jsou Rnd. Jsou známy tři různé izoformy proteinů Rnd (Rnd1/2/3), ale pouze dva z nich, Rnd1 a Rnd3, jsou schopné velice efektivně aktivovat protein p190-RhoGAP, a tak negativně regulovat činnost Rho/ROCK dráhy. U proteinu Rnd2 byl pozorován pouze velice malý inhibiční efekt na Rho GTPázu v podmínkách *in vitro* (Wennerberg *et al.*, 2003).

9.1.2.1 Popis proteinů Rnd

Proteiny Rnd1/2/3 (Rnd3 je označován také jako RhoE) patří mezi malé GTPázy spadající do rodiny Rho GTPáz. V porovnání s ostatními členy Rho rodiny GTPáz mají proteiny Rnd neobvyklé vlastnosti. Regulace Rho GTPáz, jak bylo zmíněno výše, je regulována za pomoci proteinů GEF, GAP a GDI. Proteiny Rnd nejsou tímto způsobem regulovány a vyskytují se vždy v komplexu Rnd-GTP, tedy ve svém aktivním stavu (Chardin, 2006). Je to dáno tím, že proteiny Rnd nevykazují žádnou nebo prakticky žádnou GTPázovou aktivitu (Foster *et al.*, 1996). Z tohoto důvodu musí být aktivita proteinů Rnd regulována jinak a jednou z možností je právě změna jejich genové exprese (Chardin, 2006).

9.1.2.2 Regulace proteinů Rnd

Zvýšená exprese proteinu Rnd3 byla pozorována v epiteliálních buňkách MDCK a také v lidských melanomových buňkách za použití buď onkogenní formy Ras GTPázy, která následně aktivovala signální kaskádu ERK, nebo přímo za využití konstitutivně aktivní formy proteinkinázy B-Raf. V obou případech byla signální kaskáda ERK zodpovědná za zvýšení hladiny proteinu Rnd3 (Hansen *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2008).

Pro aktivaci proteinu p190-RhoGAP je důležitá N-koncová sekvence Lys-Glu-Arg-Arg-Ala proteinů Rnd. Tato sekvence je obsažena pouze v proteinech Rnd1 a Rnd3. U proteinu Rnd2 tato sekvence nalezena nebyla, což může být jedním z důvodů jeho malé schopnosti inhibovat Rho dráhu. Tato sekvence způsobuje zacílení proteinu p190-RhoGAP do lipidových raftů, tedy k periférii buňky, a také způsobuje aktivaci proteinu p190-RhoGAP (Oinuma *et al.*, 2012). Aktivní forma proteinu p190-RhoGAP poté podporuje hydrolýzu GTP

v komplexu RhoA-GTP a inhibuje dráhu Rho/ROCK, což má za následek zvýšenou hladinu aktivní formy cofilinu a rozrušení stresových vláken (Wennerberg *et al.*, 2003).

9.1.3. Inhibice funkce proteinu CdGAP

Protein CdGAP je specifickým GAP proteinem a negativním regulátorem aktivity Rac1 a Cdc42 GTPáz. Dodnes nebyla prokázána inhibice RhoA GTPázy (Lamarche-Vane a Hall, 1998).

Při stimulaci signální kaskády ERK pomocí růstového faktoru PDGF byla pozorována interakce proteinu CdGAP s proteinkinázou ERK. Ačkoliv protein CdGAP má více fosforylačních míst o sekvenci Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro, pravděpodobně nejdůležitějším regulačním místem je Thr776 v prolin bohaté oblasti, který může být fosforylován jak proteinkinázou ERK1, tak ERK2. Po jeho fosforylaci dochází ke konformačním změnám a protein CdGAP již není schopen interagovat s GTPázami Rac1 a Cdc42 a inhibovat jejich funkci. Signální kaskáda ERK tedy vystupuje jako negativní regulátor proteinu CdGAP a jak autoři práce píší, podporuje vznik aktinové sítě (Tcherkezian *et al.*, 2005). Ačkoliv nebyla přímo sledována aktivita cofilinu, lze předpokládat, že bude po stimulaci signální kaskádou ERK daleko více fosforylován.

9.2. Regulace na úrovni proteinů GEF

Další možností vstupu signální kaskády ERK je do úrovně proteinů Rho-GEF. Zde je známa interakce mezi proteinem GEF-H1 a proteinkinázou ERK, přičemž proteinkináza ERK protein GEF-H1 aktivuje, následně dochází k aktivaci Rho GTPázy a k inaktivaci cofilinu.

9.2.1 Aktivace proteinu GEF H1

Signální kaskáda ERK je jedním z možných způsobů regulace proteinu GEF-H1. Její role v regulaci byla prokázána například jako odpověď buňky na mechanické napětí (stres). Buňka neustále snímá změny jejího podkladu skrze integriny. Pokud tedy buňka zaznamená změny v extracelulární matrix, které na ní mají deformační účinky, odpovídá na ně mimo jiné aktivací signální kaskády ERK. Ta následně přes protein GEF-H1 aktivuje signální dráhu Rho a dojde k tvorbě nových stresových vláken, které mají za úkol zpevnit buňku a odolávat tak napětí (Guilluy *et al.*, 2011). Signální kaskáda ERK, a tedy i protein GEF-H1, může být aktivována také během zánětlivé reakce. Bylo prokázáno, že prozánětlivý cytokin TNF- α

(Tumor necrosis factor α) je také schopen aktivovat dráhu ERK/GEF-H1/Rho a podporovat tvorbu stresových vláken (Kakiashvili *et al.*, 2009).

Signální kaskáda ERK fosforyluje protein GEF-H1 a tím reguluje jeho aktivitu. V tomto ohledu hraje kritickou roli fosforylace Thr678, nacházející se na C-konci proteinu GEF-H1. Fosforylace Thr678 vede ke zvýšené aktivitě proteinu GEF-H1, který podporuje výměnu GDP za GTP Rho GTPázy a aktivuje její signální dráhu. Protein GEF-H1 tedy negativně ovlivňuje aktivitu cofilinu tím, že aktivací Rho dráhy stimuluje jeho fosforylaci (Fujishiro *et al.*, 2008; Martin-Martin *et al.*, 2012).

9.3. Regulace proteinů GEF a GAP proteázou calpain

Jednou z možností regulace signalizace Rho GTPáz je proteolytická degradace proteinů GAP a GEF. Tohoto efektivního způsobu regulace se účastní řada proteáz, jednou z nich je i calpain. Je známo několik izoform této proteázy, přičemž μ -calpain a m-calpain jsou v buňkách všeobecně exprimovány (Glading *et al.*, 2002).

Calpainové proteázy jsou aktivovány vápenatými ionty. Nicméně se ukázalo, že proteáza m-calpain může být aktivována také proteinkinázou ERK. Po stimulaci buněk růstovým faktorem EGF byla prokázána interakce mezi proteinkinázou ERK a proteázou m-calpain následovaná jeho fosforylací na aminokyselinovém zbytku Ser50. Tato fosforylace je pro aktivaci proteázy m-calpain dostatečná a nevyžaduje přítomnost vápenatých iontů (Glading *et al.*, 2004). Po aktivaci může proteáza m-calpain degradovat poměrně široké spektrum proteinů, mezi kterými jsou i proteiny Tiam1 a FAK (Focal adhesion kinase). Skrze degradaci proteinkinázy FAK může proteáza m-calpain regulovat proteiny GEF a GAP.

9.3.1 Degradace proteinu Tiam1 pomocí proteázy calpain

Protein Tiam1 je jedním z GEF proteinů, který dokáže aktivovat Rac1, Cdc42 i Rho GTPázy v podmínkách *in vitro*. Nicméně v podmínkách *in vivo* se zdá, že protein Tiam1 je specifický aktivátor Rac1 GTPázy (Hordijk *et al.*, 1997). Do regulace aktivity Rac1 GTPázy může zasahovat signální kaskáda ERK, která je schopná skrze aktivaci proteázy calpain degradovat protein Tiam1, a tím dochází ke snížení aktivity Rac1 GTPázy.

Ukázalo se, že pro degradaci proteinu Tiam1 je důležitá interakce s proteinkinázou Src, která jej dokáže fosforylovat na jeho aminokyselinovém zbytku Tyr384 a podmínit jeho degradaci. Fosforylovaný Tyr384 zbytek je rozeznáván komplexem SOS-Grb2, který je klíčovým faktorem pro aktivaci signální kaskády ERK. Zároveň protein Tiam1 dokáže

interagovat svým C koncem s proteinkinázou ERK a umožňuje její aktivaci. Aktivovaná proteinkináza ERK tak může následně aktivovat proteázu calpain. Toto je důvod, proč dochází k degradaci pouze proteinu Tiam1, fosforylovaném na Tyr384. (Woodcock *et al.*, 2009). Degradace proteinu Tiam1 snižuje aktivitu Rac1 signální dráhy a může působit pozitivně na aktivitu cofilinu (Montenegro-Venegas *et al.*, 2010).

9.3.2. Degradace proteinkinázy FAK pomocí proteázy calpain

Focal adhesion kinase (FAK) je nереceptorová protein-tyrozinová kináza, která se účastní signalizace indukované interakcí integrinových receptorů s proteiny extracelulární matrix (ECM). Interakce integrinů s ECM vede k aktivaci proteinkinázy FAK a její lokalizaci do nově se tvořících fokálních adhezí, kde kromě jiných dějů proteinkináza FAK reguluje aktivitu Rho GTPázy. Mezi důležité regulační proteiny, se kterými proteinkináza FAK interaguje, patří proteiny p190-RhoGAP a p190-RhoGEF (Tomar a Schlaepfer, 2009). Proteiny p190-RhoGAP a p190-RhoGEF jsou specifické regulátory Rho GTPázy a regulací Rho signální dráhy mění aktivitu cofilinu (Bravo-Coredo *et al.*, 2011; Pullikuth a Catling, 2010).

Do takto nastíněné signální dráhy by poté mohla zasahovat proteinkináza ERK. Signální kaskáda ERK je schopná vstupovat do regulace proteinkinázy FAK skrze její degradaci za pomoci proteázy calpain. Pokud proteinkináza Src fosforyluje proteinkinázu FAK, může docházet k tvorbě komplexu FAK-ERK-calpain, který vede ke specifické degradaci proteinkinázy FAK (Carragher *et al.*, 2003). Ačkoliv vztah mezi proteázou calpain, proteinkinázou FAK a aktivitou cofilinu zatím nebyl popsán, může tento způsob představovat mechanismus specifický pro regulaci aktivity cofilinu ve fokálních adhezích.

9.4. Regulace na úrovni Rho GTPáz

Signální kaskáda ERK dokáže modulovat aktivitu přímo samotných Rho GTPáz. V tomto směru je známá regulace Rho GTPázy proteinem p27^{Kip1}. Dodnes nebyla popsána přímá regulace mezi proteinkinázou ERK a GTPázami Rac1 a Cdc42.

9.4.1. Inhibice Rho GTPázy proteinem p27^{Kip1}

Protein p27^{Kip1} patří mezi inhibitory cyklinů/cyklin-dependentních kináz (CDK). Jeho funkce je spojována hlavně s regulací buněčného cyklu, tedy může zablokovat buňku v G1

fázi a figuruje tak jako protinádorový faktor. Pro úspěšný průběh buněčného cyklu je protein p27^{Kip1} následně ubiquitinován a proteolyticky degradován (Larrea *et al.*, 2009; Polyak *et al.*, 1994).

Protože protein p27^{Kip1} je schopen zastavit buněčný cyklus, musí se s tím nádorové buňky nějakým způsobem vypořádat. Jedním ze způsobů, jak zabránit interakci mezi proteinem p27^{Kip1} a cykliny/CDK, spočívá v jeho exportu z jádra do cytoplazmy. Cytoplazmatická lokalizace proteinu p27^{Kip1} přispívá k regulaci dynamiky aktinového cytoskeletu a reguluje buněčnou migraci (Larrea *et al.*, 2009). Je třeba dodat, že protein p27^{Kip1} může zvyšovat, ale také snižovat buněčnou motilitu. Např. protein p27^{Kip1} podporuje migraci v myších embryonálních fibroblastech, naopak v endoteliálních buňkách svým vstupem do Rho signalizace migraci inhibuje (Besson *et al.*, 2004; Goukassian *et al.*, 2001). Protein p27^{Kip1} se také podílí na vyvázání stathminu, destabilizujícího faktoru pro mikrotubuly (Larrea *et al.*, 2009).

9.4.1.1. Regulace proteinu p27^{Kip1}

Regulace GTPázy Rho a následně i cofilinu je v případě proteinu p27^{Kip1} zprostředkována přímou interakcí mezi proteinem p27^{Kip1} a GTPázou Rho, přičemž signální kaskáda ERK reguluje tuto interakci skrze proteinkinázu RSK. Proteinkináza RSK fosforyluje Thr198 proteinu p27^{Kip1}. Tato fosforylace má v buňce dva významy. Jednak vede k cytoplazmatické lokalizaci proteinu p27^{Kip1}, ale také k interakci proteinu p27^{Kip1} s GTPázou RhoA. Vazba proteinu p27^{Kip1} k RhoA GTPáze nebrání interakcím s efektorovými proteiny, jakým je proteinkináza ROCK, ale brání interakci RhoA GTPázy s jejími aktivátory, tedy proteiny GEF. Z tohoto důvodu postupně klesá množství Rho-GTP a narůstá množství Rho-GDP. Signální kaskáda ERK tedy působí negativně na dráhu Rho/ROCK/LIMK inhibiční funkce RhoA GTPázy. Následkem této události dochází ke snížené fosforylaci cofilinu (Besson *et al.*, 2004; Larrea *et al.*, 2009).

9.5. Regulace na úrovni proteinkináz ROCK, PAK

Signální kaskáda ERK dokáže také regulovat aktivitu proteinkináz ROCK a PAK, efektorů rodiny Rho GTPáz. Byly objeveny tři způsoby regulace proteinkinázy ROCK. Prvním je trans-inhibice aktivity proteinkinázy ROCK díky tvorbě komplexu mezi proteinkinázami Raf1 a ROCK. Dále může být pro regulaci využíván další inhibitor

cyklinů/CDK, kterým je protein p21^{Cip1/Waf1}. Posledním způsobem je downregulace exprese proteinkinázy ROCK.

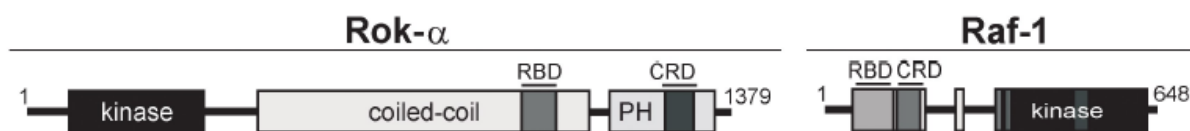
Proteinkináza ERK je také schopná fosforylovat proteinkinázu PAK, modulovat její aktivitu a regulovat skrze ni migraci buněk. Nicméně funkční vztah mezi regulací proteinkinázy PAK a aktivitou cofilinu zůstává neobjasněný.

9.5.1. Inhibice proteinkinázy ROCK proteinkinázou Raf1

Následující způsob regulace proteinkinázy ROCK je poměrně výjimečný. Této regulace se totiž neúčastní proteinkinázy ERK ani RSK, ale pouze první člen signální kaskády ERK, proteinkináza Raf1. Tento způsob regulace je založen na velice podobné doménové struktuře proteinkináz Raf a ROCK. Díky interakci mezi proteinkinázami Raf1 a ROCK může docházet k efektivní inhibici proteinkinázy ROCK.

V proteinkináze ROCK lze nalézt čtyři základní domény. Od N-konce jsou to: kinázová doména, Rho-vazebná doména a PH doména („pleckstrin homology“). V PH doméně je ještě obsažena doména bohatá na cystein (CRD) (Riento a Ridley, 2003). PH a CRD domény se účastní autoinhibice, protože se váží na kinázovou doménu a blokují její funkci (Amano *et al.*, 1999).

Ve smyslu konzervovaných domén má proteinkináza Raf1 velice podobnou strukturu jako proteinkináza ROCK. Proteinkináza Raf obsahuje 4 základní domény: na N-konci se nalézají Ras vazebná doména a CRD, přibližně v jedné třetině od N-konce je doména bohatá na serinové a threoninové zbytky a na C-konci je kinázová doména. Stejně jako proteinkináza ROCK, může i proteinkináza Raf zaujmout autoinhibiční konformaci. Svým N-koncem interaguje s kinázovou doménou a brání fosforylaci downstream substrátů proteinkinázy Raf (Udell *et al.*, 2011).



Obr. 7: Porovnání struktury proteinů ROCK a Raf1. Použité zkratky na obrázku: CRD = „cystein rich domain“; PH = „pleckstrin homology“; RBD = „Ras/Rho binding domain“ (Niault *et al.*, 2009).

Aktivace GTPáz Ras a Rho indukuje interakci s proteinkinázami Raf1, respektive ROCK. Tyto interakce vedou ke konformačním změnám, struktura proteinkináz Raf1 a ROCK se otevře a může docházet k interakcím s jejich substráty. Avšak otevřená struktura

proteinkinázy Raf1 umožňuje trans-inhibici mezi regulační částí proteinkinázy Raf1 a kinázovou doménou proteinkinázy ROCK a inhibovat její činnost (Niault *et al.*, 2009). Vyvážení a inhibice proteinkinázy ROCK za pomoci proteinkinázy Raf1 regulační domény je tak jednou z dalších možností regulace cofilinu.

9.5.2. Inhibice proteinkinázy ROCK proteinem p21^{Cip1/Waf1}

Také další inhibitor cyklinů/CDK může být efektorovým substrátem signální kaskády ERK a účastnit se regulace cofilinu. Je jím protein p21^{Cip1/Waf1}, který je schopen tvořit komplex s proteinkinázou ROCK a modulovat její vliv na proteinkinázu LIMK (Lee a Helfman, 2004). Stejně jako protein p27^{Kip1} je také funkce proteinu p21^{Cip1/Waf1} spojována hlavně s regulací buněčného dělení tím, že figuruje jako protinádorový faktor. Svou interakcí s cykliny/CDK je schopen zabránit buňce vstupu do S fáze a udržet ji v G1 fázi. Je schopen také zastavit buňku v G2 fázi (Jung *et al.*, 2010).

Stejně jako protein p27^{Kip1} se i protein p21^{Cip1/Waf1} může vyskytovat v nádorových buňkách a někdy je jeho exprese dokonce zvýšena. Byl detekován např. u nádorů prsu, plic, tlustého střeva a jeho přítomnost je spojována s vyšší invazivitou a agresivitou. Navíc figuruje jako antiapoptotický faktor. Pokud se však protein p21^{Cip1/Waf1} v těchto buňkách vyskytuje, musí i zde být nějakým způsobem odloučen od svých jaderných cílů, tedy od cyklinů a CDK. Jednou z možností je jeho přemístění z jádra do cytoplazmy, u kterého byla prokázána účast signální kaskády ERK, popř. i PI-3K a její dráhy (Cmielova a Rezacova, 2011; Lee a Helfman, 2004). Jeho cytoplazmatická lokalizace mu poté umožňuje regulovat dynamiku aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu i fokálních adhezí. Nicméně funkce proteinu p21^{Cip1/Waf1} není specifická pouze pro nádorové buňky, ale může také regulovat migraci v buňkách, které nevykazují žádnou patologii (Bouchet *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2002).

9.5.2.1. Regulace proteinu p21^{Cip1/Waf1}

Účinek proteinu p21^{Cip1/Waf1} na aktinový cytoskelet byl prokázán v buňkách transformovaných konstitutivně aktivní formou Ras GTPázy. V těchto buňkách dochází ke konstitutivní aktivaci signální kaskády ERK, která je nutná pro vstup proteinu p21^{Cip1/Waf1} do regulace aktinového cytoskeletu. Signální kaskáda ERK reguluje protein p21^{Cip1/Waf1} na dvou úrovních, přičemž obě jsou důležité pro efektivní regulaci cofilinu. Zaprvé se podílí na jeho zvýšené expresi a zadruhé podmiňuje jeho cytoplazmatickou lokalizaci. Poté, co je protein p21^{Cip1/Waf1} lokalizován v cytoplazmě, je schopný interagovat s proteinkinázou ROCK

a inhibovat jeho kinázovou aktivitu. Aktivita Rho/ROCK signální dráhy je tedy přerušena, což vede ke snížené fosforylaci cofilinu a ztrátě stresových vláken. Nicméně molekulární mechanismus, kterým signální kaskáda ERK reguluje cytoplazmatickou lokalizaci proteinu p21^{Cip1/Waf1}, zůstává neznámý (Cmielova a Rezacova, 2011; Lee a Helfman, 2004).

9.5.3. Snížení exprese proteinkinázy ROCK

Konstitutivní aktivace signální kaskády ERK, ať už mutační aktivací GTPázy Ras či proteinkinázy B-Raf, se vyskytuje v mnoha typech nádorů. Následkem konstitutivní aktivace signální kaskády ERK dochází ke změnám ve fenotypu buněk a jednou z nich je i změna v aktinovém cytoskeletu, tedy ztráta stresových vláken, popř. snížené množství fokálních adhezí a vyšší potenciál v migraci.

Změna hladiny proteinkinázy ROCK může být jedním z možných vysvětlení. Bylo prokázáno, že transformace buněk konstitutivně aktivní formou GTPázy Ras, která specificky aktivuje pouze signální kaskádu ERK, vede ke snížení hladiny proteinkinázy ROCK. Snížení hladiny proteinkinázy ROCK je indukována až na proteinové úrovni, jelikož nebyla pozorována žádná změna na úrovni mRNA. Autoři této studie se domnívají, že hladina proteinkinázy ROCK by mohla být snížena proteázami, např. činností proteázou calpain (Pawlak a Helfman, 2002b). Podobných výsledků bylo dosaženo i za použití viru Rousova sarkomu nesoucím gen v-Src, genu kódujícího tyrozinovou proteinkinázu, která také hyperaktivuje signální kaskádu ERK. I zde byla pozorována výrazně nižší hladina proteinkinázy ROCK (Pawlak a Helfman, 2002a). V obou případech, pokud byla signální kaskáda ERK inhibována, došlo k navrácení k přirozenému fenotypu buněk.

Jelikož aktivita GTPázy Rho v Ras transformovaných buňkách zůstává nezměněná, je zřejmé, že snížením hladiny proteinkinázy ROCK dochází k přerušení signalizace mezi Rho GTPázou a proteinkinázou LIMK. V takto defektních buňkách je tedy zvýšená hladina aktivního cofilinu a z tohoto důvodu nemá buňka možnost regulovat svůj aktinový cytoskelet. Navíc při hyperaktivaci signální kaskády ERK nedocházelo pouze ke zvýšení aktivity cofilinu, ale byla prokázána také deregulace i jiných aktin vazebných proteinů, které vedou k přestavbě aktinového cytoskeletu, například tropomyosinu (Pawlak a Helfman, 2002a; Pawlak a Helfman, 2002b).

9.5.4. Regulace proteinkinázy PAK

Proteinkinázy rodiny PAK („p21-activated kinase“) jsou Ser/Thr proteinkinázy, které se účastní přestavby aktinového cytoskeletu. Jak již bylo zmíněno, proteinkinázy PAK jsou efektory GTPáz Rac1 a Cdc42. Interakce s těmito GTPázami umožňuje změnu konformace proteinkináz PAK, fosforylaci na Thr423 (v případě proteinkinázy PAK1) v kinázové doméně vedoucí k aktivaci proteinkináz PAK (Chong *et al.*, 2001).

Proteinkináza PAK hraje důležitou roli při regulaci signální kaskády ERK, protože přímo fosforyluje a aktivuje proteinkinázu Raf1 a tím i signální kaskádu ERK (King *et al.*, 1998). Nicméně byl popsán také opačný vztah, totiž že ERK může modulovat funkci proteinkinázy PAK. Ukázalo se, že při stimulaci migrace buněk pomocí růstového faktoru PDGF může docházet k interakci mezi proteinkinázami ERK a PAK. Proteinkináza ERK fosforyluje proteinkinázu PAK na Thr212 (Sundberg-Smith *et al.*, 2005). Funkční význam fosforylace Thr212 není zcela jasný, ale zdá se, že přímo neovlivňuje aktivitu proteinkinázy PAK, ale umožňuje interakci s dalšími proteiny, které jsou schopné proteinkinázu PAK aktivovat (Yuan *et al.*, 2010).

Proteinkináza PAK fosforylovaná na Thr212 byla popsána u řady buněčných dějů. Jednou z jejích důležitých aktivit je přestavba cytoskeletu a podpora vývoje migrace nových nervových zakončení (Rashid *et al.*, 2001). Podobného mechanismu pravděpodobně využívá také řada nádorových buněk, kde je fosforylace Thr212 spojována s vysokou buněčnou invazivitou (Aoki *et al.*, 2007). Tedy fosforylace proteinkinázy PAK na Thr212 by mohla být jedním ze způsobů regulace cofilinu v buňkách schopných efektivní migrace.

9.6. Regulace exprese proteinkinázy LIMK2 a cofilinu

Na buňkách hladkého svalstva plicních tepen bylo prokázáno, že signální kaskáda ERK se také účastní regulace exprese proteinkinázy LIMK, respektive proteinkinázy LIMK2. Při stimulaci těchto buněk růstovým faktorem PDGF dochází k aktivaci signálních kaskád ERK a p38. Aktivace těchto kaskád stimuluje transkripci mRNA proteinkinázy LIMK2 a následně dochází ke zvýšení hladiny proteinkinázy LIMK2 i na proteinové úrovni. Zajímavé je, že při této stimulaci došlo i ke zvýšené expresi cofilinu, ale i k navýšení jeho fosforylané formy. (Bongalon *et al.*, 2004).

10. Závěr

V předchozí kapitole byly popsány jednotlivé možnosti, kterými signální kaskáda ERK zasahuje do aktivity cofilinu. Většina těchto vstupů byla na úrovni proteinů GAP a GEF, GTPáz Rho a Rac1 a jejich efektorových proteinkináz ROCK a PAK. Naopak přímá regulace proteinkinázy LIMK a cofilinu je pravděpodobně spíše výjimkou. Existuje více mechanismů, kterými může signální kaskáda ERK ovlivňovat regulaci Rho GTPáz a cofilinu. Na regulaci se může podílet na úrovni transkripce a translace (např. u proteinu Rnd), či na úrovni posttranslačních modifikací (např. fosforylací v případě proteinu GEF-H1 apod.). Dále pak existuje ještě jeden možný způsob, a tím je proteolytická degradace důležitých regulátorů signálních kaskád rodiny Rho. V případě posttranslačních modifikací či proteolytického štěpení je efekt na aktivitu okamžitý a vhodný pro dynamickou přestavbu cytoskeletu, např. při migraci. Naopak pro dlouhodobé potřeby buňka využívá změny v transkripci či translaci. Je třeba zdůraznit, že v této práci popsané vstupy se odehrávají pouze na intracelulární úrovni.

Nicméně existují také jiné způsoby regulace Rho GTPáz a tedy i cofilinu signální kaskádou ERK. Jednou z možností je regulace exprese integrinů signální kaskádou ERK. Množství integrinů v plasmatické membráně buňky může mít mimo jiné dopad na hladinu fosforylovaného cofilinu (Lai *et al.*, 2001). Ve skutečnosti tedy existuje mnohem větší variabilita mechanismů, kterými signální kaskáda ERK reguluje aktivitu cofilinu.

Důvod, proč signální kaskáda ERK vstupuje do regulace cofilinu tolika způsoby a na tolika úrovních, není zcela objasněn. Na následujících řádcích jsou navrženy některé možné důvody.

Jak bylo zmíněno, proteinkináza ERK může aktivovat protein s GEF aktivitou (GEF-H1) a inhibovat protein s GAP aktivitou (p190-RhoGAP). Pokud by docházelo k těmto dvěma regulacím Rho dráhy současně na jednom místě, mohlo by dojít ke skokovému nárůstu aktivity GTPázy Rho a cofilin by mohl být daleko efektivněji fosforylován. Tento mechanismus by tedy umožňoval zesílení počátečního signálu a rychlou a zároveň efektivní změnu ve fosforylaci cofilinu.

Signální kaskáda ERK by mohla modulovat aktivitu cofilinu také jiným způsobem, a to tvorbou zpětnovazebných regulačních smyček. Tento způsob regulace lze demonstrovat na příkladu fosforylace a exprese proteinu p27^{Kip1}. Aktivace signální kaskády ERK a fosforylace proteinu p27^{Kip1} proteinkinázou RSK podmiňuje jeho cytoplasmatickou lokalizaci, kde protein p27^{Kip1} inhibuje aktivitu GTPázy RhoA. Signální kaskáda ERK může také podporovat expresi proteinu p27^{Kip1} (Das *et al.*, 2000). Pokud by k těmto dějům docházelo najednou,

mohla by být signální dráha Rho daleko více inhibována, což by se projevilo i na množství aktivního cofilinu. Obdobným způsobem by mohla v buňce existovat také negativní zpětnovazebná smyčka, kde by signální kaskáda ERK reprimovala expresi proteinu p27^{Kip1} a tím by zastavila inhibiční vliv vůči GTPáze RhoA.

Velké množství vstupů signální kaskády ERK by mohla buňka využívat pro lokální potřeby. Buňce by tak stačilo několik málo signálních drah, které by v daném místě na základě přítomných substrátů, například proteinů GAP či GEF, generovala odpověď. Rozdílnou lokalizací substrátů v rámci jedné buňky by mohla signální kaskáda ERK na jednom místě cofilin aktivovat, a na jiném zase inhibovat.

Dalším možným důvodem by mohla být tkáňově či buněčně specifická interpretace vstupů signální kaskády ERK do regulace cofilinu. Příkladem může být cytoplasmatická lokalizace proteinu p27^{Kip1}, která v některých typech buněk migraci podporuje, a v jiných naopak inhibuje. Tento poznatek můžeme aproximovat na množství regulačních mechanismů, jakými signální kaskáda ERK reguluje cofilin. V buňce tedy mohou teoreticky probíhat všechny možnosti regulace cofilinu, avšak pouze některé z nich jsou pro buňku prospěšné a tedy buňkou využívány.

Je zřejmé, že signální kaskáda ERK může teoreticky interagovat s mnoha regulačními faktory. Fosforylační místa pro proteinkinázu ERK či pro její efektorovou proteinkinázu RSK jsou přítomna u mnoha proteinů, které se účastní regulace cofilinu, a nejenom těch zde zmíněných. Není však jasné, zda s těmito proteiny mohou proteinkinázy ERK a RSK v podmínkách *in vivo* interagovat, tyto proteiny fosforylovat a regulovat tak aktivitu cofilinu. Navíc do regulace cofilinu nemusí signální kaskáda ERK vstupovat přímo, ale využívat nejrůznější nepřímé mechanismy. Komplexita celé regulace aktivity cofilinu je tak s velkou pravděpodobností daleko větší.

11. Seznam použité literatury

Acevedo K, Moussi N, Li R, Soo P, Bernard O (2006) LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54:487-501.

Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR (1995) Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *Journal of Biological Chemistry* 270:17582-17587.

Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1999) The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 274:32418-32424.

Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S, Mizuno K (2001) LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochemical Journal* 354:149-159.

Andrianantoandro E, Pollard TD (2006) Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular Cell* 24:13-23.

Anjum R, Blenis J (2008) The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:747-758.

Aoki H, Yokoyama T, Fujiwara K, Tari AM, Sawaya R, Suki D, Hess KR, Aldape KD, Kondo S, Kumar R, Kondo Y (2007) Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 13:6603-6609.

Barisic S, Nagel AC, Franz-Wachtel M, Macek B, Preiss A, Link G, Maier D, Hausser A (2011) Phosphorylation of Ser 402 impedes phosphatase activity of slingshot 1. *Embo Reports* 12:527-533.

Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM (2004) p27(Kip1) modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & Development* 18:862-876.

Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* 348:241-255.

Bongalon S, Dai YP, Singer CA, Yamboliev IA (2004) PDGF and IL-1 beta upregulate cofilin and LIMK2 in canine cultured pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Vascular Research* 41:412-421.

Bouchet BP, Fauvet F, Grelier G, Galmarini CM, Puisieux A (2011) p21(Cip1) regulates cell-substrate adhesion and interphase microtubule dynamics in untransformed human mammary epithelial cells. *European Journal of Cell Biology* 90:631-641.

Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation* 2:357-371.

Bravo-Cordero JJ, Oser M, Chen XM, Eddy R, Hodgson L, Condeelis J (2011) A Novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Current Biology* 21:635-644.

Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays* 29:356-370.

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:50-83.

Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, Frame MC (2003) A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: Regulation by p42 ERK and Src. *Current Biology* 13:1442-1450.

Chardin P (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:54-62.

Chong C, Tan L, Lim L, Manser E (2001) The mechanism of PAK activation - Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *Journal of Biological Chemistry* 276:17347-17353.

Cmielova J, Rezacova M (2011) Protein and its function based on a subcellular localization. *Journal of Cellular Biochemistry* 112:3502-3506.

Cooper JA (2002) Actin dynamics: Tropomyosin provides stability. *Current Biology* 12:R523-R525.

CorbalanGarcia S, Yang SS, Degenhardt KR, BarSagi D (1996) Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Molecular and Cellular Biology* 16:5674-5682.

Das D, Pintucci G, Stern A (2000) MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *Febs Letters* 472:50-52.

Ellenbroek SIJ, Collard JG (2007) Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 24:657-672.

Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, Bamburg JR, Bernard O (2004) LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Experimental Cell Research* 294:392-405.

Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J (1996) Identification of a novel human rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation. *Molecular and Cellular Biology* 16:2689-2699.

Fujishiro SH, Tammura S, Mure S, Kashimoto Y, Watanabe K, Kohno M (2008) ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368:162-167.

Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A (2004) Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 24:2499-2512.

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biology* 12:46-54.

Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein-kinases. *Journal of Biological Chemistry* 266:22159-22163.

Goukassian D, Diez-Juan A, Asahara T, Schratzberger P, Silver M, Murayama T, Isner JM, Andres V (2001) Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *Faseb Journal* 15:1877-1885.

Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, O'Brien ET, Superfine R, Burridge K (2011) The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nature Cell Biology* 13:722-U211.

Hansen SH, Zegers MMP, Woodrow M, Rodriguez-Viciana P, Chardin P, Mostov KE, McMahon M (2000) Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20:9364-9375.

Hordijk PL, tenKlooster JP, vanderKammen RA, Michiels F, Oomen L, Collard JG (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278:1464-1466.

Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science* 117:4619-4628.

Huang TY, DerMardirossian C, Bokoch GM (2006) Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 18:26-31.

Jung YS, Qian YJ, Chen XB (2010) Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling* 22:1003-1012.

Kakiashvili E, Speight P, Waheed F, Seth R, Lodyga M, Tanimura S, Kohno M, Rotstein OD, Kapus A, Szaszi K (2009) GEF-H1 Mediates Tumor Necrosis Factor-alpha-induced Rho Activation and Myosin Phosphorylation role in the regulation of tubular paracellular permeability. *Journal of Biological Chemistry* 284:11454-11466.

King AJ, Sun HY, Diaz B, Barnard D, Miao WY, Bagrodia S, Marshall MS (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396:180-183.

Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE (2008) B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular Biology of the Cell* 19:498-508.

Kligys K, Claiborne JN, Debiase PJ, Hopkinson SB, Wu Y, Mizuno K, Jones JCR (2007) The slingshot family of Phosphatases mediates rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility Behavior of Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 282:32520-32528.

Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, Ohashi K, Mizuno K (2006) MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *Embo Journal* 25:713-726.

Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL (2001) ERK is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:14443-14450.

Lamarche-Vane N, Hall A (1998) CdGAP, a novel proline-rich GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac. *Journal of Biological Chemistry* 273:29172-29177.

Larrea MD, Wander SA, Slingerland JM (2009) p27 as Jekyll and Hyde Regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle* 8:3455-3461.

Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D, Smith JA, Slingerland JM (2009) RSK1 drives p27(Kip1) phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase

cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:9268-9273.

Lee S, Helfman DM (2004) Cytoplasmic p21(Cip1) is involved in ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279:1885-1891.

Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S (1999) Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895-898.

Martin-Martin N, Dan QH, Amoozadeh Y, Waheed F, McMorrow T, Ryan MP, Szaszi K (2012) RhoA and Rho kinase mediate cyclosporine A and sirolimus-induced barrier tightening in renal proximal tubular cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:178-188.

McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function. *Journal of Cell Biology* 138:771-781.

Montenegro-Venegas C, Tortosa E, Rosso S, Peretti D, Bollati F, Bisbal M, Jausoro I, Avila J, Caceres A, Gonzalez-Billault C (2010) MAP1B Regulates Axonal Development by Modulating Rho-GTPase Rac1 Activity. *Molecular Biology of the Cell* 21:3518-3528.

Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P (2008) Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy-Oxford* 231:446-454.

Niault T, Sobczak I, Meissl K, Weitsman G, Piazzolla D, Maurer G, Kern F, Ehrenreiter K, Hamerl M, Moarefi I, Leung T, Carugo O, Ng T, Baccarini M (2009) From autoinhibition to inhibition in trans: the Raf-1 regulatory domain inhibits Rok-alpha kinase activity. *Journal of Cell Biology* 187:335-342.

Nobes CD, Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *Journal of Cell Biology* 144:1235-1244.

Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *Journal of Biological Chemistry* 275:3577-3582.

Oinuma I, Kawada K, Tsukagoshi K, Negishi M (2012) Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. *Molecular Biology of the Cell* 23:1593-1604.

Pawlak G, Helfman DM (2002a) MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277:26927-26933.

Pawlak G, Helfman DM (2002b) Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* 13:336-347.

Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.

Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208-1212.

Polyak K, Lee MH, Erdjumentbromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) Cloning of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66.

Pullikuth AK, Catling AD (2007) Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: A perspective. *Cellular Signalling* 19:1621-1632.

Pullikuth AK, Catling AD (2010) Extracellular Signal-Regulated Kinase Promotes Rho-Dependent Focal Adhesion Formation by Suppressing p190A RhoGAP. *Molecular and Cellular Biology* 30:3233-3248.

Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.

Rashid T, Banerjee M, Nikolic M (2001) Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *Journal of Biological Chemistry* 276:49043-49052.

Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 114:2713-2722.

Riento K, Ridley AJ (2003) Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:446-456.

Romeo Y, Zhang XC, Roux PP (2012) Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochemical Journal* 441:553-569.

Rubinfeld H, Seger R (2005) The ERK cascade - A prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology* 31:151-174.

Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, Sampath R, Bamburg JR, Bernard O (2005) Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *Embo Journal* 24:473-486.

Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T (2001a) Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a rho-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276:670-676.

Sumi T, Matsumoto K, Shibuya A, Nakamura T (2001b) Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *Journal of Biological Chemistry* 276:23092-23096.

Sundberg-Smith LJ, Doherty JT, Mack CP, Taylor JM (2005) Adhesion stimulates direct PAK1/ERK2 association and leads to ERK-dependent PAK1 Thr(212) phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 280:2055-2064.

Tanaka H, Yamashita T, Asada M, Mizutani S, Yoshikawa H, Tohyama M (2002) Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *Journal of Cell Biology* 158:321-329.

Tcherkezian J, Danek EI, Jenna S, Triki L, Lamarche-Vane N (2005) Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site. *Molecular and Cellular Biology* 25:6314-6329.

Tomar A, Schlaepfer DD (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Current Opinion in Cell Biology* 21:676-683.

Toshima J, Ohashi K, Okano I, Nunoue K, Kishioka M, Kuma K, Miyata T, Hirai M, Baba T, Mizuno K (1995) Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *Journal of Biological Chemistry* 270:31331-31337.

Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, Mori R, Mizuno K (2001) Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:31449-31458.

Udell CM, Rajakulendran T, Sicheri F, Therrien M (2011) Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:553-565.

Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Arnpe C (2008) Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European Journal of Cell Biology* 87:649-667.

Vartiainen MK, Mustonen T, Mattila PK, Ojala PJ, Thesleff I, Partanen J, Lappalainen P (2002) The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Molecular Biology of the Cell* 13:183-194.

Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K (2005) Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by slingshot via calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 280:12683-12689.

Watanabe N (2010) Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proceedings of the Japan Academy Series a-Mathematical Sciences* 86:62-83.

Wennerberg K, Forget MA, Ellerbroek SM, Arthur WT, Burridge K, Settleman J, Der CJ, Hansen SH (2003) Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Current Biology* 13:1106-1115.

Woodcock SA, Rooney C, Lontos M, Connolly Y, Zoumpourlis V, Whetton AD, Gorgoulis VG, Malliri A (2009) Src-Induced Disassembly of Adherens Junctions Requires Localized Phosphorylation and Degradation of the Rac Activator Tiam1. *Molecular Cell* 33:639-653.

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21-44.

Yuan LP, Santi M, Rushing EJ, Cornelison R, MacDonald TJ (2010) ERK activation of p21 activated kinase-1 (Pak1) is critical for medulloblastoma cell migration. *Clinical & Experimental Metastasis* 27:481-491.

Zigmond SH (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Current Opinion in Cell Biology* 16:99-105.